昆虫病毒增效剂研究进展

郭慧芳[1,2]，方继朝[1]，韩召军[2]
（1. 江苏省农业科学院植物保护研究所，南京 210014；2. 南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘要：概述了昆虫病毒增效剂方面的研究进展，重点述及生物增效剂病毒增强素及化学增效剂荧光增白剂的增效活性特点和增效机理，以及病毒增强素分子生物学方面研究进展。在颗粒体病毒、核型多角体病毒、昆虫痘病毒中均发现了病毒增强素，它是一种金属蛋白酶。已克隆多个病毒增效基因，并构建了含增效基因的重组病毒和转基因作物。二苯乙烯类荧光增白剂对病毒具有增效作用。已明确病毒增强素和荧光增白剂增效作用与昆虫围食膜的破坏有关，其他增效机理有待进一步研究。还就增效剂的应用前景进行了展望。

关键词：昆虫病毒；增效剂；病毒增强素；荧光增白剂
中图分类号：Q965.8　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296（2003）06-0766-07

Advances in insect virus synergists

GUO Hui-Fang[1,2]，FANG Ji-Chao[1]，HAN Zhao-Jun[2]（1. Institute of Plant Protection，Jiangsu Academy of Agricultural Sciences，Nanjing 210014，China；2. College of Plant Protection，Nanjing Agricultural University，Nanjing 210095，China）

Abstract：This paper summarized the recent advances in insect virus synergists，including the synergistic characteristics and mechanism of viral enhancin，a biological synergist from insect viruses，and the optical brightener，a chemical synergist. The paper also gave a framework of the molecular biology of enhancin. Viral enhancin was found in nuclear polyhedrosis virus，granulosis virus，cytoplasmic polyhedrosis virus and entomopoxvirus，and it was metalloproteases. Several enhancin genes have been cloned，based on that，some enhancin recombinant virus and plant has been constructed. Optical brightener with enhancing activity were stilbenes. It has been confirmed that the destruction of peritrophic membrane contributed to the enhancement of viral infectivity by synergists. Other mechanism related to the enhancement needs further study. Finally the use of insect virus synergists was discussed.

Key words：Insect virus；synergists；insect virus enhancing；optical brightener

昆虫病毒作为生物杀虫剂，除了具有对天敌安全、不污染环境和不易产生抗药性等生物农药普遍存在的优点外，更因其能在害虫种群中形成流行病而长期控制虫口这一明显优于其它杀虫剂的特点而长期受到人们关注。然而，病毒杀虫剂的应用尚存在以下三个问题：一是杀虫范围窄，二是作用速度较慢，三是杀虫效率较低。这大大束缚了病毒杀虫剂的大面积生产应用，目前仅占整个农药市场的0.2%。为此，如何通过增效剂的作用来提高天然昆虫病毒的利用效率就成了病毒研究的热点。对病毒增效剂的研究包括生物增效剂和化学增效剂，且主要集中在生物增效剂中的病毒增强素及化学增效剂中的荧光增白剂上。

1　生物增效剂——病毒增强素

病毒增强素来源于昆虫病毒，曾被称之为增效因子（synergistic factor）、病毒增强因子（viral enhancing factor）或增强蛋白（enhancing protein），现统称增强素（enhancin）。自 Tanada（1959）首次发现美洲粘虫 *Pseudaletia unipuncta* 颗粒体病毒（granulosis virus，GV）对其核型多角体病毒（nuclear polyhedrosis virus，NPV）存在增效作用以来，已陆续发现了多种颗粒体病毒具有增效活性，除颗粒体

基金项目：江苏省重点基金项目（BK2002207）；江苏省自然科学基金项目（BK2001180）；国家“十五”重大攻关项目（2002BA516A01）
作者简介：郭慧芳，女，1973年7月生，江苏高邮人，博士研究生，助研，主要从事害虫生物防治研究，E-mail：guohf@jaas.ac.cn
收稿日期 Received：2003-05-21；接受日期 Accepted：2003-07-22

病毒外，还发现了一些核型多角体病毒、昆虫痘病毒（entomopoxvirus，EPV）和质型多角体病毒（cytoplasmic polyhedrosis virus，CPV）等也对核型多角体病毒有增效活性。

1.1　病毒增强素的增效活性

至目前为止，已通过活体生物测定发现了2种昆虫痘病毒、5种颗粒体病毒、2种核型多角体病毒和2种质型多角体病毒对核型多角体病毒具有增效活性（表1）。病毒间增效作用具有如下特点：（1）增效活性包括提高杀虫活性、杀虫速度及扩大杀虫谱。有些病毒增强素只具备其中一种增效作用，也有同时具备以上三种增效作用。（2）所有已发现的增效作用均是对核型多角体病毒的增效作用，这里并不排除其可能对其它种类病毒也有增效作用，只是因为大家研究的重点均是在应用最广泛的核型多角体病毒上。（3）病毒增强素的增效作用具有一定程度的广谱性，如美洲粘虫颗粒体病毒（PuGV）增强素可同时提高PuNPV对美洲粘虫、东方粘虫 *Pseudaletia separata* NPV（PsNPV）对东方粘虫、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* NPV（SlNPV）对斜纹夜蛾的感染力，但降低了家蚕 *Bombyx mori* NPV（BmNPV）对家蚕的感染力（Hukuhara *et al.*，1987）。（4）病毒增强素的增效活性受其用量及存在状态（是经纯化还是存在于病毒包涵体中）、寄主昆虫龄期、被增效病毒种类等影响，如：PuGV对PuNPV的增效活性最高，PsNPV次之，SlNPV最低，而对BmNPV则无增效作用；八字地老虎 *Xestia c-nigrum* GV（XcGV）在以八字地老虎5龄幼虫为靶标对象时对XcNPV有显著增效作用，在以4龄幼虫为对象时则无增效活性（Goto，1990）；PuGV活体对PuNPV的增效倍数为14 000～17 000倍，而纯化增强素的增效倍数为1 100～5 300倍（Hukuhara *et al.*，1987）。

表1　已发现的病毒增强素

Table 1　Varieties of viral enhancin

含增强素的病毒 Virus with enhancin	被增强的病毒 Enhanced virus	作用对象 Target	文献 References
昆虫痘病毒 EPV			
Pseudaletia separata EPV	PuNPV	*Pseudaletia separata*	Xu *et al.*，1992
Anomala cuprea EPV	BmNPV	*Bombyx mori*	Mitsuhashi *et al.*，1998
颗粒体病毒 GV			
Pseudaletia unipuncta GV	PuNPV	*Pseudaletia unipuncta*	Tanada，1959
	PsNPV	*Pseudaletia separata*	Xu *et al.*，1992
	HaNPV	*Pseudaletia separata*	丁翠等，1995
	AcNPV	*Pseudaletia separata*	丁翠等，1995
Trichoplusia ni GV	AcNPV	*Trichoplusia ni*	Derksen *et al.*，1988
	AcNPV	*Pseudaletia unipuncta*	Wang *et al.*，1994
	AcNPV	*Helicoverpa zea*	Wang *et al.*，1994
	AcNPV	*Spodoptera exigua*	Wang *et al.*，1994
Xestia c-nigrum GV	XcNPV-tetra	*Xestia c-nigrum*	Goto，1990
	XcNPV-tri	*Xestia c-nigrum*	Goto *et al.*，1992
	XcNPV-tri	*Pseudaletia separata*	Goto *et al.*，1992
	XcNPV-tri	*Mamestra brassicae*	Goto *et al.*，1992
	MbNPV	*Mamestra brassicae*	Goto *et al.*，1992
	MbNPV	*Helicoverpa assulta*	Goto *et al.*，1992
	SlNPV	*Spodoptera litura*	郭慧芳等，2003
Helicoverpa armigera GV	LdNPV	*Lymantria dispar*	Shapiro，2000
Spodoptera frugiperda GV	LdNPV	*Lymantria dispar*	Shapiro，2000
质型多角体病毒 CPV			
Dasychira pudibunda CPV	DpNPV	*Dasychira pudibunda*	Lobinger，1991
	LdNPV	*Lymantria dispar*	Lobinger，1991
	LmNPV	*Lymantria monacha*	Lobinger，1991
Macdunniughia confusa CPV	SlNPV	*Spodoptera litura*	郭慧芳等，2003
核型多角体病毒 NPV			
Agrotis segetum NPV	HaNPV	*Helicoverpa armigera*	白小东和丁翠，2000
Helicoverpa armigera NPV	SlNPV	*Spodoptera litura*	Ramarethinam *et al.*，1997

增强素不仅能在昆虫活体内提高病毒的感染力，也能在体外增加病毒感染力。PuGV 增强素可增加 PuNPV、苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica* NPV（AcMNPV）、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* NPV（TnNPV）对昆虫细胞感染力（Uchima *et al*.，1988），PuEPV 增强素亦可增加核型多角体病毒对细胞的感染力（Hukuhara and Wijonarko，2001a）。与同活体内，增强素的增效活性对某些病毒-细胞组合具有一定的特异性。

1.2　病毒增强素的定位及其生化特性

对颗粒体病毒增强素的研究最早也最多，关于其存在位置及生化特性已基本达成共识。颗粒体病毒增强素存在于其包膜蛋白中，是一种脂蛋白，由多肽和磷脂组成，分子量在 104 ~ 120 kD（Zhu *et al*.，1989）。进一步的研究表明颗粒体病毒增强素是一种金属蛋白酶（Lepore *et al*.，1996）。在昆虫痘病毒中仅研究了 PuEPV 增强素，早期研究表明 PuEPV 增强素存在于球状体，该蛋白质分子量为 38 kD，是一种均一的糖蛋白，与颗粒体病毒增强素氨基酸组成上相似，酸性氨基酸比例较高，但血清学特性与颗粒体病毒增强素不同（Xu *et al*.，1994）。此后通过免疫反应发现昆虫痘病毒增强素存在于昆虫痘病毒球状体、纺锤体和来源于组织昆虫痘病毒病毒粒子，而不存在于来源于球状体的病毒粒子（Wijonarko and Hukuhara，1998）。虽然已发现具有增效活性的核型多角体病毒，但还未提纯核型多角体病毒增强素，只是在舞毒蛾 *Lymantria dispar* NPV（LdNPV）和蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* NPV（McNPV）中发现了与颗粒体病毒增效基因有一定同源性的基因（Bischoff and Slavicek，1997；Holly *et al*.，2001；Li *et al*.，2003）。其中 LdNPV 中发现了 2 个与 GVs 增强素同源的增效基因 E1 和 E2，表达产物的分子量分别为 89 kD 和 88 kD，E2 基因与 E1 基因及 PuGV、XcGV 及棉铃虫 *Helicoverpa armigera* GV（HaGV）增效基因编码的氨基酸上具有 30% 的同源性，失活 E1 基因的重组病毒对舞毒蛾的感染力下降了 2.3 倍，失活 E2 基因的病毒感染力下降了 1.8 倍，同时失活 E1 和 E2 基因的病毒感染力下降了 12 倍，表明此基因表达的蛋白质可提高 LdNPV 的毒力，并且也是一种金属蛋白酶。在 McNPV 中发现的增效基因与其它增效基因在编码的氨基酸上有 20% 的同源性，表达的蛋白质分子量为 98 kD，也为一种金属蛋白酶。将 McNPV 增效基因插入 AcNPV 中，获得的重组病毒对蓓带夜蛾的毒力提高了 4.4 倍。而黄地老虎 *Agrotis segetum* NPV（AsNPV）多角体蛋白和病毒粒子均可提高 HaNPV 的感染力和杀虫速度，免疫研究表明 AsNPV 多角体、病毒粒子和 PuGV 增强素之间无同源性，但与 HaNPV 多角体间有较高的同源性（白小东和丁翠，2000）。

1.3　病毒增强素分子生物学研究

现已测定了 8 种病毒增效基因的序列，它们分别为：PuGV，TnGV，HaGV，XcGV，云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* NPV（CfNPV），LdMNPV，McNPV 和 PsEPV，其中在 XcGV 和 LdMNPV 中分别发现了 4 个和 2 个不同的增效基因（Hashimoto and Corsaro，1991；Roelvink *et al*.，1995；Hayakawa and Hukuhara，1996；Bischoff and Slavicek，1997；Hayakawa *et al*.，1999；Holly *et al*.，2001；刘强等，2001；Li *et al*.，2003）。这 12 种增效基因除 XcGV E4 基因外所编码的蛋白质均具有典型的锌结合域，表明增强素为一种金属蛋白酶。包括 GV 和 NPV 在内的杆状病毒增强素在 N 末端同源性最高，特别是在包含有锌结合域的 200 ~ 300 氨基酸区，同源性在 20% 以上，而在 C 末端同源性最低，在 7% 以下。依据所有已知杆状病毒增强素氨基酸序列建立的进化树表明，12 种增强素可分为两大簇，其中 TnGV、CfGV、PuGV、HaGV 和 XcGV E3 同属家簇 1，LdMNPV E1，LdMNPV E2，McNPV，XcGV E1，XcGV E2 和 XcGV E4 形成家簇 2。在家簇 1 中，TnGV、CfGV、PuGV 形成一类群，HaGV 和 XcGV E3 则形成另一类群。家簇 2 亦分成两大类群，McNPV，XcGV E1 和 XcGV E2 属于一类群，LdMNPV E1，LdMNPV E2 和 XcGV E4 成为另一类群。家簇 2 中的增强素氨基酸数量（783 ~ 867）低于家簇 1（900）（Li *et al*.，2003）。

所有杆状病毒增效基因的启动子均为晚期启动子 ATAAG 或 TTAAG，其中 LdMNPV E1 和 E2、PuGV 增效基因有一个晚期启动子 ATAAG，而 TnGV 和 HaGV 增效基因则分别含有 2 个和 3 个晚期启动子 TTAAG，每个 XcGV 增效基因也都有 1 个或 2 个启动子。晚期启动子的存在表明增强素可能在侵染后期被表达，这已在 LdMNPV、TnGV 和 McNPV 等中得到证实，LdMNPV E1 增效基因在侵染 Ld652Y 细胞 48 h 后才开始转录（Bischoff *et al*.，1997），而 TnGV 在侵染粉纹夜蛾幼虫 6 天后增效基因转录（Hashimoto *et al*.，1991），同样 McNPV 增效基因在其自身启动子的调节下重组入 AcMNPV 也是

作为晚期基因（Li *et al*.，2003）。研究还发现具增效作用的杆状病毒基因组均较大，GV 为 170 kbp 以上，LdMNPV 和 McNPV 分别为 161 kbp 和 155 kbp，比已知的核型多角体病毒约大 25 ~ 30 kbp，并且这些病毒本身作用速度较慢。可能大基因组病毒产生了不同的侵染策略以克服寄主特异性屏障如围食膜等（Li *et al*.，2003）。

将 TnGV 增效基因插入广谱病毒 AcMNPV p10 启动子下游，得到的重组病毒增强素表达量高，但形成多角体数量下降，形状变小，感染性略低于野生 AcMNPV，重组病毒与野生病毒以适当比例混合时，则在保证增强素有较高表达量时多角体形状正常，从而使感染能力高于单用野生病毒（Zhong and Granados，1998）。此外，还得到了插入 McNPV 增效基因的重组 AcMNPV 及失活增效基因的 LdMNPV，它们的毒力均得到明显提高。除构建重组病毒外，还可将增效基因在原核细胞中表达。已将 PsEPV 增效基因在大肠杆菌中成功表达，表达产物经胰蛋白酶或凝血酶处理后显著提高了 PsMNPV 对东方粘虫的感染力（Hukuhara *et al*.，2001b）。PsEPV 增效基因还成功转入水稻中，得到了可增强 PuNPV 对东方粘虫感染力的转基因水稻（Hukuhara *et al*.，1998）。含增效基因的转基因马铃薯和转基因烟草也已成功构建（Granados，1999，私人通讯；Hukuhara，1999，私人通讯）。

1.4　病毒增强素的增效机理

关于病毒增强素的增效机理研究还仅集中在颗粒体病毒上，且观点不一。对于颗粒体病毒增强素在活体内的增效机理存在两种观点，一种观点认为颗粒体病毒增强素作为一种结合分子，促进病毒粒子对中肠细胞的吸附。因在 PuGV 增强素起增效作用的美洲粘虫幼虫中肠细胞上有增强素特异性结合位点，而无增效作用的家蚕幼虫中肠细胞膜上没有特异性结合位点，免疫酶标电镜也证明 PuGV 增强素的作用位点是中肠微绒毛膜（Uchima *et al*.，1988）。但在 TnGV 具增效作用的 4 种昆虫中，仅美洲粘虫上有其特异性结合位点，粉纹夜蛾、美国棉铃虫和甜菜夜蛾这 3 种昆虫中均未发现颗粒体病毒特异性结合位点，因此还不能确定病毒增强素的增效作用是由于其与中肠细胞的特异性结合而增加病毒粒子的吸附作用（Wang *et al*.，1994）。另一种观点则认为 GV 增强素作为破坏围食膜的蛋白水解酶，增大围食膜的孔径从而增加对核型多角体病毒的通透性。已发现 TnGV 增强素可损伤粉纹夜蛾幼虫围食膜，并改变其蛋白质电泳图谱（Derksen and Granados，1988）。对围食膜进一步研究发现其中有一种高度糖基化的由 807 或 788 个氨基酸组成的昆虫肠粘蛋白（insect intestinal mucin，IIM），昆虫消化液中的蛋白酶不能消化分解 IIM，而 PuGV 增强素能够体外降解 IIM，且从取食 PuGV 增强素的粉纹夜蛾幼虫粪便中未检查到 IIM，而对照中有。这些都充分说明 PuGV 增强素的底物为 IIM，通过降解 IIM，提高 AcMNPV 的感染力（Wang and Granados，1997a，1997b）。另外还直接检测出粉纹夜蛾围食膜的孔径在 TnGV 增强素作用后增大，且随增强素浓度增大，孔径扩张程度增加（Peng *et al*.，1999）。由于上述两种不同观点所用的研究对象不同，是否不同颗粒体病毒增强素有着不同的作用方式，或者同一增强素在作用于不同对象特别是同源宿主核型多角体病毒和异源宿主核型多角体病毒时，其作用方式各异，除了中肠和围食膜外，颗粒体病毒增强素还有无其它作用靶标，这些均值得进一步研究。增强素体外如何增加核型多角体病毒感染也未明确。在细胞培养中杆状病毒可通过胞饮作用或膜融合入侵细胞并建立感染，其中胞饮作用是主要途径，还未知晓增强素通过上述哪种途径作用。虽已通过免疫过氧化物酶和免疫荧光定位观察到 PuGV 增强素于细胞表面，但不能由此肯定其是特异性结合于细胞膜表面，有可能是非特异性蛋白与蛋白作用的结果（Hukuhara and Zhu，1989；Hukuhara and Wijonarko，2001）。此外，对于核型多角体病毒、昆虫痘病毒和质型多角体病毒增效机理研究还是空白，亟待深入研究。

2　化学增效剂——荧光增白剂

荧光增白剂（optical or fluorescent brightener）是一类普遍用于纺织、造纸、塑料等行业的化学物质，它能吸收日光中的紫外线而发射波长为 415 ~ 466 nm 的荧光。

2.1　荧光增白剂的增效活性

最初研究荧光增白剂对病毒增效作用是利用其对紫外线的吸收作用从而保护病毒免受紫外线的破坏。由于一般的紫外线保护剂如叶酸、刚果红等都是吸收紫外线中的 280 ~ 310 nm 的 UV-B 波段，而对紫外线中的 320 ~ 400 nm 的 UV-A 波段的吸收更为重要，因此能同时吸收 A 和 B 两波段的紫外线吸收剂将是更为有效的紫外线保护剂。荧光增白剂

可同时吸收两波段的紫外线，Shapiro（1992b）发现多种荧光增白剂对舞毒蛾核型多角体病毒具有紫外线保护作用，其中二苯乙烯类荧光增白剂保护效果最高，可达 100%。进一步研究表明荧光增白剂不仅具有保护昆虫病毒免受紫外线的破坏，而且还可提高病毒本身的毒力（Shapiro，1992a）。Shapiro 的这一发现获得了专利。此后，相继发现了荧光增白剂在舞毒蛾、秋粘虫、棉铃虫、大豆夜蛾、芹菜夜蛾、云杉卷叶蛾、小地老虎和甜菜夜蛾等多种害虫中对核型多角体病毒的增效作用（Sheppard and Shapiro，1994；Vail *et al.*，1996；Zou and Young，1996；Argauer and Shapiro，1997；Li and Otvos，1999a，1999b，1999c；Martinez *et al.*，2000；Shapiro，2000a，2000b；Shapiro *et al.*，2001；Boughton *et al.*，2001）。

荧光增白剂与病毒增强素的增效特点不尽相同：（1）荧光增白剂的增效活性包括提高病毒毒力和加快杀虫速度。（2）荧光增白剂在增效作用范围上具有广谱性，而增效程度上存在一定的特异性，即在一种寄主-病毒系统中有活性的荧光增白剂在所有系统中均有活性，但同一荧光增白剂在不同的系统中的活性不同。如 Blankophor HRS 在甜菜夜蛾-SeMNPV 中活性最高，而在舞毒蛾-LdMNPV 中，其活性低于 Blankophor BBH、Tinopal LPM、Blankophor P167 和 Blankophor RKH。相反，那些在某一系统中不起作用的荧光增白剂在其它系统中也无增效作用，如 Blankophor BSU、Blankophor DML 和 Blankophor LPG 在云杉卷叶蛾-SfNPV，舞毒蛾-LdMNPV，甜菜夜蛾-SeMNPV（Otvos and Li，1999；Shapiro and Argauer，2001）中均无增效活性。荧光增白剂不仅能增强核型多角体病毒的感染力，而且也可提高质型多角体病毒和昆虫痘病毒的感染力。（3）荧光增白剂的增效活性与其使用浓度有关。对 Tinopal LPW 的研究表明，其增效活性最适浓度为 0.25% ~1%，浓度为 0.01% ~0.1%时无明显增效作用，浓度过高则抑制昆虫进食（Vail *et al.*，1996）。

当前已发现的对病毒有增效活性的荧光增白剂结构相似，均为二苯乙烯类，可见它们增效活性的不同并不是由于结构上的明显差异所造成。一般含磺酸基越多，荧光增白剂的水溶性越高，但这并不与增效活性相关。因在甜菜夜蛾-SeNPV 中，增效活性最高的荧光增白剂 Blankophor HRS 有 2 个磺酸基，而无增效活性的 Blankophor BSU 有 6 个磺酸基；在舞毒蛾-LdMNPV 中，活性最高的荧光增白剂具有 2 个或 4 个磺酸基。由于有增效活性的 R 基包括甲胺（Blankophor HRS，Blankophor RKH）或二（羟乙基）氨基（Blankophor BBH，Blankophor P167），而无活性的荧光增白剂含苯胺（Blankophor LPG）或吗啉（1，4-氮氧六环）（Blankophor DML），故荧光增白剂 R 基的不同可能与增效活性相关。上述荧光增白剂的 pH 在 6.9 到 9.5 之间，因而 pH 值大小与增效活性无关（Shapiro and Argauer，2001）。

2.2　荧光增白剂的增效机理

有关荧光增白剂对病毒的增效机理研究较少，研究靶标集中在昆虫中肠上。Sheppard 等（1994）认为荧光增白剂 Tinopal LPM 对 LdMNPV 的增效作用可能与其使昆虫中肠 pH 值下降有关。但 Shapiro 等（2000）认为中肠 pH 值下降是病毒感染中肠细胞的结果。Washburn 等（1998）则认为 pH 值下降是因为荧光增白剂阻止了被病毒感染中肠上皮细胞的脱落，这是荧光增白剂增效的主要原因。而 Wang 等（2000）对围食膜的研究表明，荧光增白剂 Calcofluor 通过竞争性结合到几丁质上，阻止蛋白质的结合而破坏围食膜，这是增效的原因。荧光增白剂究竟是作用于中肠细胞还是围食膜，除此之外，有无其它靶标，这些都还需要进一步的研究。

3　病毒增效剂的应用展望

有关病毒增强素增效活性的报道都还是室内研究结果。实现病毒增强素的田间应用可通过下列三种途径：（1）直接将具有增效作用的两种病毒组合混用；（2）用基因工程构建可表达增强素的重组病毒；（3）利用基因工程生产转基因植物。实施上述第一种途径主要建立在发现增效病毒组合的基础上，开发周期短，但由于要分别增殖两种病毒而使生产成本增加，只可作为短期内的应急措施。后两种途径由于利用基因工程产生的重组病毒或转基因植物，使用方便且成本低，但开发周期较长，并且因其表达稳定性较差及安全性问题，虽已获得了几个工程生物（Zhong and Granados，1998；Hukuhara *et al.*，1998；Granados，1999，私人通讯；Hukuhara，1999，私人通讯），近期内还难以实现大面积生产应用，不过这是病毒增强素今后的发展方向。

荧光增白剂对大豆夜蛾、芹菜夜蛾和粘虫的增效活性已在田间得到证实，为其大面积应用展示了美好前景，但荧光增白剂的田间应用需同时考虑以

下几方面：（1）田间活性与室内活性的一致性。因为并不是所有室内具有增效活性的荧光增白剂在田间同样有效，如荧光增白剂 Calcofluor White M2R 在室内可显著提高 NPV 对小地老虎的毒力，但在温室和大田下无增效活性。这主要是由于在较为开放的植物如棉花上，荧光增白剂更多地暴露于紫外线照射下而分解，较为遮荫的植物则因提供了较好的紫外线保护而使增效活性发挥正常（Boughton *et al*.，2001）。（2）荧光增白剂的应用成本。如在美国南部地区荧光增白剂作为核型多角体病毒增效剂防治云杉卷叶蛾时，只有在田间使用浓度为 0.1% 才是可行的（Martinez *et al*.，2000）。（3）荧光增白剂本身是否具有副作用也是值得注意的问题。

参 考 文 献 （References）

Argauer R，Shapiro M，1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth（Lepidoptera：Lymantriidae）baculovirus. *J. Econ. Entomol.*，90（2）：416 – 420.

Bai X D，Ding C，2000. Study on synergistic action of *Agrotis segetum* nuclear polyhedrosis. *J. Appl. Environ. Biol.*，6（1）：52 – 55.［白小东，丁翠，2000. 黄地老虎 NPV 增效作用的研究. 应用环境与生物学报，6（1）：52 – 55］

Bischoff D S，Slavicek J M，1997. Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantra dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*，71：8 133 – 8 140.

Boughton A J，Lewis L C，Bonning B C，2001. Potential of *Agrotis ipsilon* nuceopolyhedrovirus for suppression of the black cutworm（Lepidoptera：Noctuidae）and effect of an optical brightener on virus efficacy. *J. Econ. Entomol.*，94（5）：1 045 – 1 052.

Derksen A G，Granados R R，1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*，167：242 – 250.

Ding C，Deng T，Cai X Y，1995. Enhancement of baculovirus infection by the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm. *Acta Entomol. Sinica*，38（4）：407 – 413.［丁翠，邓塔，蔡秀玉，2001. 粘虫颗粒体病毒增效因子的基因定位. 昆虫学报，44（2）：407 – 413］

Goto C，1990. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus（NPV）infection by a granulosis virus（GV）isolated from the spotted cutworm，*Xestia c-nigrum* L.（Lepidoptera：Noctuidae）. *Appl. Ent. Zool.*，25（1）：135 – 137.

Guo H F，Fang J C，Luo W J，Zhang H，2003. Synergism of different insect viruses to *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua*. *Chinese J. Biol. Control*，19（1）：23 – 26.［郭慧芳，方继朝，罗伟杰，张海，2003. 不同昆虫病毒对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的联合增效作用. 中国生物防治，19（1）：23 – 26］

Hashimoto Y，Corsaro B G，1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J. Gen. Virol.*，72：2 645 – 2 651.

Hayakawa T，Xu J H，Hukuhara T，1996. Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from *Pseudaletia separata* entomopoxvirus. *Gene*，177：269 – 270.

Hayakawa T，Ko R，Okano K，Seong S L，Goto C，Maeda S，1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulosis virus genome. *Virology*，262：277 – 297.

Holly J R，David S B，James M S，2001. Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancin genes contribute to viral potency. *J. Virol.*，75（18）：8 639 – 8 648.

Hukuhara T，Tamura K，Zhu Y F，1987. Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections. *Appl. Ent. Zool.*，22（2）：235 – 236.

Hukuhara T，Zhu Y F，1989. Enhancement of the in vitro infectivity of a nuclear polyhedrosis virus by a factor in the capsule of a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*，54（1）：71 – 78.

Hukuhara T，Hayakawa T，Wijonarko A，1998. The mode of action and transgenesis of a virus enhancing factor of an entomopoxvirus. Proceedings of VIIth International Colloquium on the Invertebrate Pathology and Microbial Control and of IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Sapporo. 7 – 8.

Hukuhara T，Wijonarko A，2001a. Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus. *J. Invertebr Pathol.*，77（1）：62 – 67.

Hukuhara T，Hayakawa T，Wijonarko A A，2001b. Bacterially produced virus enhancing factor from an entomopoxvirus enhances nucleopolyhedrovirus infection in armyworm larvae. *J. Invertebr. Pathol.*，78（1）：75 – 80.

Lepore L，Roelvink P R，Granados R R，1996. Enhancin，the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus（NPV）infections，is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.*，68：131 – 140.

Li S Y，Otvos I S，1999a. Comparison of the activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners against laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis*（Lepidoptera：Tortricidae）. *J. Econ. Entomol.*，92（3）：534 – 538.

Li S Y，Otvos I S，1999b. Optical brightener enhance activity of a nuclear polyhedrosis virus against western spruce budworm（Lepidoptera：Tortricidae）. *J. Econ. Entomol.*，92（2）：335 – 339.

Li S Y，Otvos I S，1999c. Differential mortality between male and female *Choristoeura occidentalis*（Lepidoptera：Tortricidae）larvae expoed to a baculovirus with or without optical brighteners. *Can. Entomol.*，131：65 – 70.

Li Q，Li L，Moore K，Donly C，Theilmann D A，Erlandson M，2003. Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. *J. Gen. Virol.*，84：123 – 132.

Liu Q，Ye Y，Bai X D，Ding C，2001. Location of the gene encoding synergistic factor of the *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus. *Acta Entomol. Sinica*，44（2）：148 – 154［刘强，叶寅，白小东，丁翠，2001. 粘虫颗粒体病毒增效因子的基因定位. 昆虫学报，44（2）：148 – 154］

Lobinger G，1991. On the synergism of a cytoplasmic polyhedrosis virus（DpCPV）isolated from *Dasychira pudibunda* L.（Lep.，Lymantriidae）

in mixed infections with different nuclear polyhedrosis viruses. *J. Appl Ent.*, 112: 4 335 – 4 340.

Martinez A M, Goulson D, Chapman J W, Caballero P, Cave R D, Williams T, 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica? *Biol. Control*, 17: 174 – 181.

Mitsuhashi W, Furuta Y, Mamoru S, 1998. The spindles of an entomopoxvirus of Coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance their infectivity of a nucleopolyhedrovirus in Lepidoptera (*Bombyx mori*). *J. Invertebr. Pathol.*, 71: 186 – 188.

Peng J X, Zhong J, Granados R R, 1999. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.*, 45: 159 – 166.

Ramarethinam S, Marimuthu S, Murugesan N V, 1997. Relative changes in the pathogenicity of HNPV and SNPV in their original hosts after alternate passages in *Helicoverpa armigera* (H.) and *Spodoptera litura* (F.). *Indian J. Environ. Toxicol.*, 7 (2): 83 – 86.

Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R, 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *J. Gen. Virol.*, 2 693 – 2 705.

Shapiro M, 1992a. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. *J. Econ. Entomol.*, 85 (4): 1 120 – 1 124.

Shapiro M, 1992b. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 85 (5): 1 682 – 1 686.

Shapiro M, 2000a. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.*, 93 (3): 572 – 576.

Shapiro M, 2000b. Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantiidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 93 (6): 1 633 – 1 637.

Shapiro M, Argauer R, 2001. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 94 (2): 339 – 343.

Sheppard C A, Shapiro M, 1994. Physiological and nutritional effects of a fluorescent brightener on nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* (L.) larvae (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biol. Control*, 4: 404 – 411.

Tanada Y, 1959. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Pathol.*, 1: 215 – 231.

Uchima K, Harvey J P, Omi E M, 1988. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*). *Insect Biochem.*, 18: 645 – 650.

Vail P V, Hoffmann D F, Tebbets J S, 1996. Effect of a fluorescent brightener on the activity of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuid pests. *Biol. Control*, 7: 121 – 125.

Wang P, Hammer D A, Granado R R, 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four Lepidoptera insects. *J. Gen. Virol.*, 75: 1 961 – 1 967.

Wang P, Granados R R, 1997a. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 94: 6 977 – 6 982.

Wang P, Granados R R, 1997b. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *J. Biol. Chem.*, 272 (26): 16 663 – 16 669.

Wang P, Granados R R, 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 135 – 143.

Washburn J O, Kirkpatrick B A, Haas S E, 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biol. Control*, 11: 58 – 69.

Wijonarko A, Hukuhara T, 1998. Detection of a virus enhancing factor in the spheroid, spindle, and virion of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 72 (1): 82 – 86.

Xu J H, Hukuhara T, 1994. Biological properties of an enhancing factor of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 68 (1): 14 – 18.

Xu J H, Hukuhara T, 1992. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 60 (3): 259 – 264.

Zhong J, Granados R R, 1998. Engineering *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) with enhancin. Proceedings of VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control and of IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Sapporo. 65.

Zhu Y F, Hukuhaua T, Tamura K, 1989. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 54: 49 – 56.

Zou Y, Young S Y, 1996. Use of fluorescent brightener to improve *Psedoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.*, 89: 92 – 96.